Aus der Kinderklinik der Stadt Braunschweig
Chefarzt: Prof. Dr. J. Oehme

Experimentelle Beiträge zum Phyto - Haemagglutinations - Test

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Reinhard Tomerius
aus Schneidemühl

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Kinderklinik der Stadt Braunschweig
Chefarzt: Prof. Dr. J. Oehme

Experimentelle Beiträge zum Phyto - Haemagglutinations - Test

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Reinhard Tomerius

aus Schneidemühl

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 21.11.1968
Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. W. Straub
Referent: Prof. Dr. med. J. Oehme
Correferent: Prof. Dr. med. G.A. Martini

Inhaltsverzeichnis Seite

I. Einleitung

1) Bedeutung des PHA - Tests als in vitro-Kopie cellulärer immunologischer Abwehr 3

a) Wirkungsweise des PHA auf Lymphocyten

b) Morphologie des Lymphoblasten 5

c) metabolische Leistung des Lymphoblasten 6

2) Lymphocytentransformation in vitro als Antwort auf Stimulation mit verschiedenen Antigenen 6 - 7

3) Auftreten des Lymphoblasten bei der Abstoßung von Transplantaten und Bedeutung des Lymphocytentransformations-Tests zur Auswahl geeigneten Materials 7 - 8

II. Methodik 8

III. Eigene Untersuchungen zu Fragen

1) der Inkubationsdauer der Kulturen 9 - 12

2) der Histokompatibilität 12 - 15

3) der immunbiologischen Reifung 15 - 17

a) PHA - Stimulation bei Immaturen

b) PHA - Stimulation bei Praematuren

IV. Diskussion der Ergebnisse 17 - 22

V. Zusammenfassung 23

VI. Literaturverzeichnis 24 - 30

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534905_0049

I. Einleitung

Die Diskussion um die Frage, ob der Lymphocyt als Endprodukt einer abgeschlossenen Entwicklungsreihe zu betrachten ist, oder ob er unter funktionellen Beanspruchungen eine " reaktive Umbildungsfähigkeit " (35) zeigt und in welcher Beziehung die Funktion der Lymphocyten zur Allergie vom verzögerten Typ steht (10) ist nie ganz verstummt.

Nowell (41) beobachtete 1960 bei Arbeiten zur Chromosomenanalyse nach Zusatz von Phytohaemagglutinin (PHA) das Auftreten von großen Lymphocyten. PHA, ein Auszug aus Phaseolus vulgaris, benutzte er wegen seiner Fähigkeit, Erythrocyten zu agglutinieren. Die großen Lymphocyten - " blastenartige Zellen " - zeigten eine rege mitotische Aktivität. Daß diese Lymphoblasten aus der Umwandlung von kleinen Lymphocyten entstehen, ist experimentell geklärt worden (34,40).

Bei Untersuchungen über die Natur des PHA ließ sich ein haemagglutinierender Faktor von einem Mitosen- und Blastenbildenden Faktor trennen (7,36). Endgültige Klarheit über die Wirkungsweise des PHA auf den Lymphocyten besteht allerdings noch nicht. Es ist zu vermuten, daß der blastenbildende Faktor des PHA mit einem strukturellen Bestandteil der Zelle in Reaktion tritt, möglicherweise der Zellmembran oder dem Zellkern, oder aber mit einem spezifischen

Antikörper, der an die Zelle gebunden ist (46). Astaldi (1) entwickelte die Hypothese, daß es sich bei der PHA - Stimulation der Lymphocyten um einen immunologischen Mechanismus vom Typ der Antigen - Antikörper Reaktion handelt. Er deutet das Auftreten von Lymphoblasten als eine Rückdifferenzierung zu einer Stammzelle des lymphocytären Systems, gewissermaßen als eine Aktivierung des Lymphocyten aus der Ruheform (26). Folgerichtig führt er eine fehlende Antwort des Lymphocyten auf PHA - Stimulation auf einen cellulären Defekt des Lymphocyten zurück und postuliert eine mögliche Koexistenz von immunologisch kompetenten und nicht kompetenten Lymphocyten (2). Gestützt wird diese Hypothese durch den Nachweis, daß Lymphocyten in Anwesenheit von PHA Gamma - Globulin produzieren (5). Die Tatsache, daß sich Lymphoblasten auch durch zahlreiche spezifische Antigene hervorrufen lassen (27,39), ist eine weitere Stütze der Hypothese Astaldis. Ferner findet man Lymphoblasten auch bei der Abstoßung von Transplantaten (23). Die Angabe, daß sich bei diesen Versuchen eine geringere Zahl von Lymphoblasten findet, spricht wohl nur für eine unspezifische Wirkungsweise des PHA (46). In der Literatur werden sogar Beobachtungen von weitergehenden Transformationen kleiner Lymphocyten zu Plasmazellen und Makrophagen beschrieben (22).

Mit Fischer und Gropp (26,27) sind wir bei der Wertung dieser Befunde der Ansicht, daß die Transformation von Lymphocyten zu Lymphoblasten als immunocytologische Reaktion aufgefaßt werden kann. Die Autoren bezeichnen die transformierten Zellen als Immunoblasten. Es steht uns also mit dem PHA - Test ein in - vitro Modell für immunocytologische Reaktionen zur Verfügung.

Morphologisch bieten die in vitro Kulturen nach 72 - stündiger Inkubation folgendes Bild :
Im nach Pappenheim gefärbtem Ausstrich finden sich neben spärlichen Lymphocyten und Monocyten fast nur noch große " blasten - ähnliche Zellen ". Das Cytoplasma der Zellen ist deutlich basophil, es enthält meist mehrere große Vacuolen. Die Zellen zeigen verschiedene Ausläufer, Zeichen einer lebhaften amöboiden Beweglichkeit, wie lebend unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet wurde (26,27,46). Man findet die Blasten in Haufen und Zellverbänden liegend, Ausdruck der mitotischen Teilung und der Tendenz zu haftfußähnlichem Benetzen an eine Unterlage (27,46). Der Basophilie des Plasmas entspricht eine lebhafte RNS - Synthese, die durch markiertes Cytidin oder 3H - Uridin nachgewiesen werden kann (13,14,18,33). Das Ausmaß der PHA - induzierten Transformation kann durch diese Markierung, durch das Auszählen der blastenartigen Zellen in den Kulturen (26) oder in der Erfassung der mitotischen Proliferation aktivierter Zellen im sog. " stathmokinetischen Index " (50) registriert werden.

Cytochemische Untersuchungen (26,46) ergaben folgende Befunde :
Im Cytoplasma der Lymphoblasten lassen sich grobe sudanschwarzfärbbare Lipidgranula nachweisen, die bei den üblichen Färbemethoden herausgelöst werden und als typische Vacuolen imponieren. Eine cytochemisch faßbare Menge von ATP - ase, die mit der lebhaften Motilität in Zusammenhang zu bringen ist, ist im Lymphoblasten

vorhanden. Während des Vorgangs der Transformation wird Glucose aus vorhandenen Glykogen - Depots unter Bildung von Milchsäure verbraucht.
Untersuchungen zum Nucleinsäure - Metabolismus führten zu folgendem Ergebnis: Nach 30 Minuten kommt es zu einem Abfallen der Gesamt - RNS, nach einer Stunde findet sich eine beschleunigte Synthese von RNS, nach 24 Stunden wird DNS synthetisiert (14). Die RNS - Synthese findet sich auch im kleinen Lymphocyten, DNS - Synthese nur im Lymphoblasten. RNS - Synthese und Transformation sind also notwendige Schritte zur DNS - Synthese und Teilung des Lymphoblasten (13,14,18,33).

Ausgehend von der Hypothese, daß die Stimualtion von Lymphocyten mit PHA zu Lymphoblasten ein Modell einer immunocytologischen Reaktion auf ein Antigen darstellt, wurden Versuche unternommen, Lymphocyten mit spezifischen Antigenen zu stimulieren. Zuerst gelang das durch Zusatz von Tuberkulin bei Kulturen tuberkulin - positiver Patienten (17,39,53). Bald danach konnten Elves und Mitarbeiter zeigen, daß sich durch Polio - Vaccine, Tetanus - Toxoid, Pocken - Vaccine und Diphtherie - Toxoid an sensibilisierten Lymphocyten Transformationen erreichen ließen (17). Andere erreichten dies durch Stimulation mit Streptolysin S (38). Bei Stimulation von Antigen - Kombinationen kommt es nicht zu einer Summation der Wirkung verschiedener Antigene (15). Gegenüber der Stimulation mit PHA tritt die Wirkung der spezifischen Antigene verspätet auf und ist nur in geringerem Prozentsatz effektiv (26).

Die Versuchsanordnung legt es nahe, auch andere Antigene, z.B. Medikamente zu testen; so wurde ein Allergie - Test bei Penicillin - sensibilisierten Patienten beschrieben (29). Weiterhin bestehen bei diesem in - vitro Versuch die verschiedensten Möglichkeiten, autoimmunologische Vorgänge zu reproduzieren.

Bei Untersuchungen über die Rolle der Lymphocyten bei der Abstoßung von Nierentransplantaten bei Kaninchen beschrieben Porter et al. (45) das Auftreten von großen pyroninophilen Zellen. Kleine Lymphocyten werden im Lymphknoten zu großen sich teilenden Zellen, die wieder kleine Lymphocyten freisetzen. Diese " immunologisch kompetenten " Zellen verlassen den Lymphknoten, dringen über den Blutstrom in das Transplantat ein und bewirken seine Abstoßung (25). Sie sind dort zwei Tage vor der Nekrose des Transplantats nachzuweisen. Die Antwort gegen das Fremdgewebe auf cellulärer Ebene ist nach Gowans (23,24) die Transformation des kleinen Lymphocyten zum Lymphoblasten, der immunologisch kompetente Zellen freisetzt. Lymphoblasten sind von verschiedenen Autoren während der Abstoßungsreaktion von Transplantaten beschrieben worden (8,40,56), von Wiener et al. (56) werden sie"Graft rejection cells" genannt. Problematisch bleibt aber das Übertragen solcher Beobachtungen auf die Befunde von in - vitro Kulturen.
Von Bain (3,4) und Bach (6) wurde der Modellversuch einer in vitro Transplantation durch Mischkulturen von Leukocyten verschiedener Spender unternommen.
Dabei traten in 10 - 30 Prozent Lymphoblasten auf,

bei eineiigen Zwillingen in weniger als 1 %, bei zweieiigen Zwillingen waren die Ergebnisse unterschiedlich. Dieser Versuch sollte zu einem möglichen Histokompatibilitätstest führen (3,4,6,19,30,47), um geeignetes Transplantationsmaterial auszuwählen. Er trat damit in Konkurrenz zum Lymphocyten - Transfer - Test (11). Der PHA - Test wird nicht nur durch den Zeitfaktor belastet, weshalb er auf Leichenspender kaum auszudehnen ist (22), sondern auch durch die häufig beschriebenen Spontan - Transformationen (12,13,28,48,49).

II. Methodik

Das zu untersuchende Blut wurde unter sterilen Cautelen in einer 10 ml Spritze, die 0,8 ml Liquemin enthielt entnommen und anschließend Liquemin und Blut sorgfältig durchmischt. Die Spritze wurde dann senkrecht auf den Stempel gestellt und eine Stunde lang zur Sedimentierung bei 37 Grad C im Brutschrank aufbewahrt. In vorbereitete Erlenmeyer - Kolben, die 5 ml Tissue Culture Medium 199 (Difco, USA) und 1000 IE Na - Penicillin G enthielten, wurde das Plasma zu gleichen Teilen abgefüllt.
In den Kolben A (Testkolben) wurde 0,1 ml Phytohaemagglutinin (Wellcome, London) gefüllt. Die Kontroll - kultur im Kolben B blieb ohne PHA. Anschließend wurden die Kulturen bei 37 Grad C inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen abgebrochen. Sie wurden in Spitzröhrchen bei 800 U/min (100g) fünf Minuten lang zentri - fugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde abpipettiert. Das Sediment wurde auf Objektträger gebracht, die mit

Äther - Alkohol entfettet worden waren, und ausgestrichen. Nach Trocknung und Methanol - Fixierung folgte die Färbung mit May - Grünwald 1 : 10 und Giemsa 1 : 25. Anschließend folgte die lichtmikroskopische Musterung, bei der jeweils 400 Zellen ausgezählt wurden und nach Lymphocyten, Lymphoblasten und Mitosen differenziert wurden.
Bei den Untersuchungen zur Frage der günstigsten Abbruchszeit der Kulturen wurden 40 ml Blut des Spenders entnommen und zehn Kulturen (Test- und Kontrollkultur) angesetzt, die zu verschiedenen Zeiten abgebrochen und ausgewertet wurden.
Bei den Mischkulturen wurden gleiche Teile Plasma der beiden Spender als Test- und Kontrollkultur angesetzt. Außerdem wurden Test- und Kontrollkultur des einzelnen Spenders angelegt.
Bei den Untersuchungen über die PHA - Stimulierbarkeit der Frühgeborenen wurde unmittelbar post mortem Blut aus der Nabelvene oder durch Herzpunktion gewonnen und je eine Test- und Kontrollkultur angesetzt.

III. Eigene Untersuchungen

1. zu Fragen der Inkubationsdauer der Kulturen

Allgemein werden in der Literatur PHA - stimulierte Lymphocyten - Kulturen nach 72 - stündiger Inkubationsdauer abgebrochen und ausgewertet. Nicht zuletzt aber der Zeitfaktor mindert den Wert des PHA - Tests zur Auswahl geeigneten Transplantationsmaterials.
Wir haben daher von fünf Blutspendern Lymphocytenkulturen mit PHA angesetzt und zu verschiedenen Zeiten abgebrochen.

Tabelle 1 : Blastenrate bei verschiedenen Abbruchszeiten der Lymphocytenkulturen

Spender 1.)	nach 9 Std.	0 % Blasten
	nach 22 Std.	0 % Blasten
	nach 33 Std.	0 % Blasten
	nach 48 Std.	90,5% Blasten
	nach 60 Std.	83 % Blasten
	nach 72 Std.	93 % Blasten
	nach 96 Std.	95 % Blasten
Spender 2.)	nach 9 Std.	0 % Blasten
	nach 22 Std.	0 % Blasten
	nach 33 Std.	1,3% Blasten
	nach 48 Std.	55 % Blasten
	nach 60 Std.	87 % Blasten
	nach 72 Std.	94,2% Blasten
	nach 96 Std.	93,5% Blasten
Spender 3.)	nach 24 Std.	0 % Blasten
	nach 31 Std.	4 % Blasten
	nach 42 Std.	59,5% Blasten
	nach 48 Std.	90,5% Blasten
	nach 54 Std.	83 % Blasten
Spender 4.)	nach 24 Std.	0 % Blasten
	nach 31 Std.	6,2% Blasten
	nach 42 Std.	64,2% Blasten
	nach 48 Std.	93 % Blasten
	nach 54 Std.	91 % Blasten
Spender 5.)	nach 48 Std.	93 % Blasten
	nach 60 Std.	87,3% Blasten
	nach 72 Std.	94,3% Blasten
	nach 84 Std.	90,9% Blasten
	nach 96 Std.	92,9% Blasten

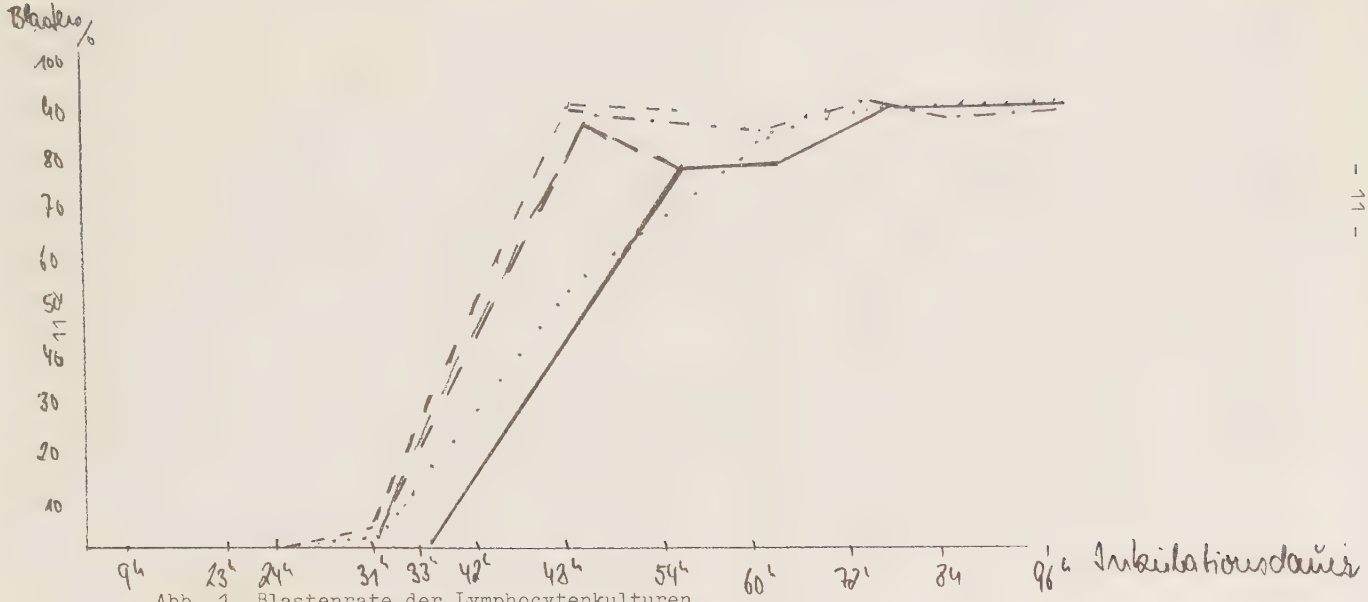

Abb. 1. Blastenrate der Lymphocytenkulturen bei verschiedenen Abbruchszeiten.

Wie aus den tabellarischen Angaben und aus der Abbildung 1.) zu erkennen ist, sind nach PHA - Stimulation Lymphoblasten in einem niederen Prozentsatz von 1,3 - 6,2 % nach 31 bzw. 33 Stunden im Ausstrich nachzuweisen. Der Anteil an Lymphoblasten steigt dann von der 42. bis zur 48. Stunde steil an, in der er einen Wert erreicht, der sich von der Prozentzahl der Lymphoblasten nach einer Inkubationsdauer von 72 bzw. 96 Stunden nicht mehr wesentlich unterscheidet.

2. zu Fragen der Histokompatibilität

Von Bain (6) und Bach (4) wurde die Lymphocyten - Mischkultur als möglicher Histokompatibilitätstest zur Auswahl geeigneten Transplantationsmaterials angegeben. Zur Histokompatibilitätsprüfung wurden von uns Mischkulturen von zehn nicht verwandten Blutspendern - fünf gleicher Blutgruppen, fünf ungleicher Blutgruppen - angesetzt, um die immunologische Verwandtschaft mit Hilfe des PHA - Tests zu prüfen.
Die Lymphocyten - Mischkulturen brachten folgende Ergebnisse (s. Tabelle 2 und 3):
Es fanden sich große blastenartige Zellen, die in ihrem cytologisch färberischen Verhalten völlig mit den PHA - stimulierten Zellen übereinstimmten. Sie besaßen einen großen locker strukturierten Kern mit mehreren typischen Vacuolen und der charakteristischen Basophilie des Cytoplasmas. Es bestand die gleiche Tendenz zur Bildung von rosettenartigen Kolonien. Auffällig war, daß wir in drei von zehn Mischkulturen überhaupt keine Lymphoblasten fanden, in den übrigen Kulturen einen

Tabelle 2.) Lymphocyten - Mischkulturen nicht verwandter Spender gleicher Blutgruppen

Fall 1.	Spender 1.	Spender 2.
	A_1Rh pos.	A_1Rh pos.
	76 % Blasten	86,5 % Vlasten mit PHA
	in der Mischkultur 2,5 % Blasten	
Fall 2.	Spender 1.	Spender 2.
	A_1rh neg.	A_1rh neg.
	89,5 % Blasten	82,25 % Blasten mit PHA
	in der Mischkultur 2,75 % Blasten	
Fall 3.	Spender 1.	Spender 2.
	A_1rh neg.	A_1rh neg.
	84,25 % Blasten	80,5 % Blasten mit PHA
	in der Mischkultur 3 % Blasten	
Fall 4.	Spender 1.	Spender 2.
	O rh neg.	O rh neg.
	92,95 % Blasten	93,8 % Blasten mit PHA
	in der Mischkultur 5 % Blasten	
Fall 5.	Spender 1.	Spender 2.
	A_1rh neg.	A_1rh neg.
	91,7 % Blasten	95 % Blasten mit PHA
	in der Mischkultur 13 % Blasten	

Tabelle 3.) Lymphocyten - Mischkulturen nicht verwandter Spender ungleicher Blutgruppen

Fall 1.	Spender 1.	Spender 2.
	B Rh pos.	A_2 Rh pos.
	85 % Blasten	84,3 % Blasten mit PHA
	in der Mischkultur keine Blasten	
Fall 2.	Spender 1.	Spender 2.
	A_2 Rh pos.	B Rh pos.
	84 % Blasten	77 % Blasten mit PHA
	in der Mischkultur keine Blasten	
Fall 3.	Spender 1.	Spender 2.
	B Rh pos.	A_1B Rh pos.
	86 % Blasten	87 % Blasten mit PHA
	in der Mischkultur keine Blasten	
Fall 4.	Spender 1.	Spender 2.
	A_1Rh pos.	O Rh pos.
	90 % Blasten	93,7 % Blasten mit PHA
	in der Mischkultur 1,5 % Blasten	
Fall 5.	Spender 1.	Spender 2.
	A_2 Rh pos.	B Rh pos.
	92,2 % Blasten	94,7 % Blasten
	in der Mischkultur 2,5 % Blasten	

geringen Prozentsatz transformierter Zellen erreichten und nur in einem Fall 13 % Blasten nachweisen konnten. In Kontrollansätzen, in denen die Blutzellen der Spender ohne PHA gezüchtet wurden, waren in keinem Fall Lymphoblasten nachweisbar; im Ansatz mit PHA fand sich eine normale Transformierbarkeit von 80 - 90 %. Eine Abhängigkeit der Lymphocytentransformation vom ABO bzw. Rh - Blutgruppensystem bestand nicht.

3. Zu Fragen der immunbiologischen Reifung :
PHA - Stimulation bei Immaturen und Praematuren .

Die PHA - Stimulation der Lymphocyten als in vitro - Modell immunocytologischer Reaktionen legt es nahe, die immunologische Lage bei Früh- und Reifgeborenen zu prüfen. Diese Frage ist von besonderem Interesse, seitdem es bewiesen ist, daß es zu einer materno - fetalen Passage von immunologisch kompetenten Zellen kommt.

Wir haben unmittelbar postmortal bei Immaturen und Praematuren Blut aus der Nabelschnur oder durch Herzpunktion entnommen und Lymphocytenkulturen mit PHA inkubiert.

Tabelle 4. PHA - Stimulation bei Immaturen und Praematuren

Gewicht	% transformierter Zellen
A. Immature	
1) 650 g	86 %
2) 690 g	89 %
3) 700 g	87 %
4) 750 g	97 %
5) 800 g	88 %
6) 900 g	90,3 %
7) 940 g	89 %
8) 1200 g	87 %
9) 1200 g	90,8 %
10) 1200 g	84,3 %
11) 1250 g	90 %
B. Praemature	
1) 1700 g	84 %
2) 2000 g	90,2 %
3) 2140 g	94,3 %
4) 2230 g	93 %

Die Ergebnisse zeigen, daß sich die Prozentzahlen transformierter Zellen nicht von den Ergebnissen bei PHA - Stimulation von Lymphocyten Erwachsener unterscheiden. Gemessen am PHA - Lymphocytenfunktionstest ist ein 650 g schweres Immatures also schon erstaunlich früh " reif " und unterscheidet sich nicht im Lymphocytenfunktionstest vom Reifgeborenen und Erwachsenen.

IV. Diskussion der Ergebnisse

ad 1.) Die PHA - Stimulation von Lymphocyten eignet sich als Lymphocytenfunktionstest bei Erkrankungen des lymphocytären Systems (54), zur in vitro Kontrolle immunosuppressiver Therapie, vielleicht auch als objektivierbarer Beweis desensibilisierender Therapie. Inwieweit die Transformierbarkeit der kleinen Lymphocyten zur Auswahl geeigneten Transplantationsmaterials brauchbar ist, ist durchaus strittig. Ein großer Nachteil ist aber der zeitliche Aufwand. Vorteilhaft wäre es also, gleiche Ergebnisse der Lymphocytenkulturen bei kürzerer Inkubationszeit zu ermitteln. Die Angaben über die Inkubationsdauer schwanken in den Literaturangaben von 48 Stunden bis zu 5 Tagen (19,20,26,30,41,47,54). Bei unseren Versuchen unterschied sich der prozentuale Anteil von Lymphoblasten in der Kultur nach 48- stündiger Inkubationsdauer nicht wesentlich vom Ergebnis nach 72- oder 96- stündiger Imkubation.
Bei der verhältnismäßig groben Methode der Auszählung

von Lymphoblasten im Ausstrich könnte also eine Zeitersparnis von 24 Stunden erreicht werden, was bei immerhin 48- stündiger Inkubation sicher nicht als großer zeitlicher Gewinn zu betrachten ist. Genaue Messungen des mitotischen und stathmokinetischen Index nach Astaldi (2,49) lassen aber die gemeinhin übliche 72 - stündige Inkubationsdauer sicherer und zuverlässiger erscheinen. Ein weiterer Vorteil ist, daß der Vergleich der Ergebnisse bei gleicher Methodik erleichtert wird und aussagekräftiger ist.
Wir haben deshalb nach diesen Voruntersuchungen, die keine wesentliche Zeitersparnis brachten, bei unseren Lymphocytenkulturen eine 72 - stündige Inkubation eingehalten.

ad 2.) Neben theoretischer Bedeutung für Reaktionen aus dem Kreis der Allergie vom verzögerten Typ soll die Lymphocyten - Mischkultur auch praktische Wichtigkeit als Histokompatibilitäts - Test haben. Bei unseren Mischkulturen von zufällig in die Klinik kommenden Blutspendern konnten wir in drei von zehn Fällen überhaupt keine Blasten finden, in den übrigen Fällen fand sich ein sehr niedriger Prozentsatz von Blasten in der Mischkultur, bei normaler Stimulierbarkeit in der Kontrolle mit PHA.
Auch Fischer und Gropp (20) geben in einigen Kulturansätzen nur 3 - 7 % aktivierte Lymphocyten an. Elves und Israels (18) berichten von einer Untersuchung einer Serie von 165 unausgewählten Spendern nur in 24 % der Fälle über Ergebnisse, die gegenüber den Kontrollen als eindeutig positiv zu bewerten sind.

Auffällig ist jedenfalls die relativ große Schwankungsbreite der Ergebnisse der verschiedenen Mischkulturen. Diese Befunde stehen in eindeutigem Gegensatz zu der hohen Rate von Transplantations - Reaktionen und positivem Lymphocyten - Transfer - Test (11,31). Die Befunde von Bain, Bach,Lowenstein (4,6), daß sich keine Lymphocyten in Mischkulturen eineiiger Zwillinge transformieren lassen und daß die Blastenrate bei Mischkulturen Blutsverwandter herabgesetzt ist (6,30), erscheinen zwar theoretisch sehr verlockend und einsichtig; dagegen steht allerdings die geringe Rate von transformierten Zellen in Mischkulturen unausgewählter Spender anderer Untersucher (18,19,25,32,33) und unsere eigenen Befunde.
Die praktische Brauchbarkeit des Tests zur Prüfung der Histokompatibilität wird weiter belastet durch Arbeiten, die über das Auftreten von spontan - transformierten Lymphocyten berichten (28,48,49). Diese, ohne Einwirkung von PHA, Antigenen oder fremden Lymphocyten, auftretenden Blasten sollen besonders nach 5- tägiger Inkubation, wie sie zur Antigen - Stimulation gebräuchlich ist, nachweisbar sein. Diese Berichte sind allerdings nicht unwidersprochen geblieben. Caron (12) fand in Kulturansätzen von 1 - 7 Tagen keine spontan transformierten Zellen. Er benutzte zur Auswertung die Markierung mit 3H - Thymidin. Möglicherweise beruhen die Berichte von " spontan " gebildeten Blasten auf einer Fehlinterpretation oder Verwechslung mit Makrophagen oder ähnlich gestalteten Zellen. In unseren Versuchen - wir inkubierten bis zu 96 Stunden - traten in 0,2 % der Fälle spontan transformierte Zellen auf.

Bei der großen Schwankungsbreite mehrfach angesetzter Kulturen gleicher Spender (19) kann man nur von einer mäßigen, möglicherweise verbesserungsfähigen Reproduzierbarkeit sprechen (32). Wegen des erheblichen zeitlichen Aufwandes kann die Untersuchung nicht auf Leichenspender angewandt werden. Theoretisch ist die Möglichkeit mit dem Lymphocytentransformationstest einen einfachen Histokompatibilitätstest zu haben, sehr verlockend, praktisch aber nicht überzeugend.

ad 3.) Die Versuchsanordnung des PHA - Tests als in - vitro - Prüfungsmethode immunocytologischer Reaktion legt es nahe, die Lage und Entwicklung der immunologischen Abwehr des Früh- und Reifgeborenen zu testen. Weitverbreitet ist die Ansicht, daß der Fetus immunologisch schutzlos ist. Nach Good (21) ist der Gamma - Globulin Spiegel im Serum Neugeborener geringgradig höher als im Serum der Mutter. Die Gamma - Globulin - Konzentration im Serum fällt in den ersten Lebenstagen dann rapide ab. In dieser Zeit kann das Neugeborene nicht von einem Patienten mit Hypogammaglobulinaemie unterschieden werden, nur daß dieser Zustand vorübergehender Natur ist. Altersmäßig folgt dann die Bildung von Gamma $_M$- Antikörpern, während erst im Alter von 3 - 4 Wochen Gamma $_G$- Antikörper gebildet werden (16). Plasmazellen lassen sich in der Gamma $_M$ - Periode noch nicht nachweisen. Wheeler (55) erklärt die hohe Anfälligkeit der Neugeborenen und besonders der Frühgeborenen gegenüber den Staphylokokkeninfektionen

mit einem Abfallen des Antistaphylosin - Titers bis zum Alter von 2 Monaten. Bei Frühgeborenen soll nach Silverman (51) die Phagocytosefähigkeit der Leukocyten herabgesetzt sein, was neben äußeren Umständen ein höheres Risiko des Frühgeborenen gegenüber der bakteriellen Infektion beinhaltet. Einen hemmenden Einfluß auf die Antikörperbildung des Neugeborenen und jungen Säuglings haben die passiv von der Mutter übergetretenen Anti - körper. Diese unterdrücken in Abhängigkeit von der Konzentration im Plasma die aktive Antikörperbildung. (52)

Seitdem es bewiesen ist, daß es nicht nur zu einer materno - fetalen Passage von Erythrocyten, sondern auch von Granulocyten und Lymphocyten kommt (44), ist die Frage nach der Antwort des Foeten auf diese Fremdzellen von besonderem Interesse. Man nahm an, daß es abhängig von der Zeit und der Zahl der übergetretenen Zellen in einem immunologisch schutzlosen Wirtsorganismus zur Ansiedlung immunologisch kompetenter Zellen kommt, die sich gegen das Antigensystem des Wirts richten. Dieser pathogenetische Mechanismus sollte zur Klärung der Runt - Disease dienen, einem Syndrom, das durch Minderwuchs, Milz- und Lymphknotenschwellung, Dermatitis, periorale und perianale Exkoriationen gekennzeichnet ist (9,43). Die Pathogenese setzt einen immunologisch schutzlosen Wirt voraus, der durch Fremdzellensensibilisierung geschädigt wird. Eine Runt - Disease konnte aber beim Neugeborenen nicht nachgewiesen werden; ein Lymphocyten - Chimärismus konnte nach Austauschtransfusionen nicht beobachtet werden. Die übergetretenen immunologisch kompetenten Zellen konnten sich

im Wirtsorganismus also nicht ansiedeln und vermehren, sondern wurden zerstört. Das setzt eine immunologische Abwehrfähigkeit des Wirts voraus. Lindahl - Kiessling und Böök (37) berichten von mit PHA stimulierten Lymphocyten bei Neugeborenen, die sich von den mit PHA aktivierten Zellen Erwachsener an Aussehen und Zahl nicht unterschieden und kennzeichneten dieses Geschehen als immunocytologische Erstreaktion. Oehme (42) benutzte die PHA-Stimulation als Lymphocyten - Funktionstest bei reifen Neugeborenen und konnte dabei auch die gleiche immunologische Antwort wie bei Erwachsenen nachweisen. Gleiche Befunde teilt Robbins mit (45,46).
Erstmalig stimulierten wir Lymphocyten von Immaturen und Praematuren. Bei einer Untersuchungsserie von Frühgeborenen von 650 g bis zu 2230 g ergab sich eine Blastenrate um ca. 90 %. Damit ergeben sich keine Unterschiede zu den Ergebnissen aus mit PHA stimulierten Lymphocytenkulturen Erwachsener mit immunologisch intakter Abwehrlage.
Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß ein Foet sehr geringen Reifegrades ein erstaunlich funktionstüchtiges zellgebundenes Immunsystem zur Verfügung hat. Er ist damit in der Lage, materno - fetal übergetretene Lymphocyten zu vernichten und die Ansiedlung von Fremdzellen zu verhindern.

V. Zusammenfassung

Mit dem Phytohaemagglutinations - (PHA -) Test steht uns ein in vitro Modell für immunocytologische Reaktionen zur Verfügung; dabei erfolgt nach Zusatz von PHA eine Transformation von Lymphocyten zu Lymphoblasten.

In Untersuchungen zu Fragen der Inkubationsdauer der Lymphocytenkulturen zeigten wir, daß sich die Blastenrate nach 48 - stündiger Inkubation nicht wesentlich von der nach üblicher 72 - stündiger Inkubation unterscheidet. Dennoch erscheint es zweckmäßig, sich auf die gemeinhin übliche 72 - stündige Inkubationsdauer zu einigen.

Zur Prüfung der Histokompatibilität setzten wir Mischkulturen nicht verwandter Blutspender gleicher und ungleicher Blutgruppen an. Lymphoblasten als Ausdruck einer Gewebsunverträglichkeit konnten wir in dieser Versuchsanordnung nur in einem geringen Prozentsatz nachweisen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zur hohen Rate von Transplantationszwischenfällen und positivem Lymphocytentransfer- Test. Deshalb halten wir den PHA - Test zur Prüfung der Histokompatibilität für nicht geeignet.

Zur Prüfung der immunbiologischen Lage von Immaturen und Praematuren führten wir bei diesen Kindern Lymphocytenstimulationen mit PHA durch. Danach unterscheidet sich die Transformationsrate Frühgeborener nicht von der Reifgeborener und Erwachsener.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß Frühgeborene nach Stimulation ein funktionstüchtiges zellgebundenes Immunsystem zur Verfügung haben, so wie sie auch nach Antigenzufuhr humorale Antikörper bilden können. Schon Immature und Praemature sind somit in der Lage, materno - fetal übergetretene Lymphocyten zu vernichten und eine Fremdzellensensibilisierung (Runt - Disease) zu verhindern.

VI. Literaturverzeichnis

1) Astaldi,G. " Das Phytohaemagglutinin und das Problem der Lymphocyten "
Med. Klin. 59:368 (1964)

2) Astaldi,G.,Airo,R. " Phytohaemagglutinin in Human Lymphocytes in short - term tissue culture "
Boll. Ist. Sieroter, Milanese 45:5(1966)

3) Bach,F.H.,Voynow,N.K. " One Way stimulation in Mixed Leukocyte Cultures "
Science 153:545(1966)

4) Bach,F.,Hirschhorn,K. " Lymphocyte Interaction: A Potential Histokompatibility Test in vitro "
Science 143:813(1964)

5) Bach,F.,Hirschhorn,K. " Gamma - Globulin Production By Human Lymphocytes in vitro "
Exp. Cell Res. 32:592(1963)

6) Bain,B.Vas,M.R.,Lowenstein,L. " The Development of Large Immature Mononuclear Cells in Mixed Leukocytes Cultures "
Blood 23:108(1964)

7) Barkhan,P.,Ballas,A. " Phytohaemagglutinin: Separation of Haemagglutinating and Mitogenetic Principles "
Nature 12:141(1963)

8) Brent,L.,Medawar,P.B. " Cellular Immunity and the Homograft Rejaction "
British Medical Bulletin 23:55(1967)

9) Billingham, R. " Runt Disease as a Complication of Inducing Tolerance to Homologous Tissues with Lymphoid Cells "
Report 29th Ross Ped. Res. Conf.53(1959)

10) Braunsteiner,H. " Funktion der Leukocyten "
Internist 3:7(1962)

11) Bridges,J.M.,Nelson,S.D.,Mc Geown,M.G. " Evaluation of Lymphocyte Transfer Test in normal and Uraemic Subjects "
Lancet I 581(1964)

12) Caron, G.A. " Spontaneous Lymphocyte Transformation in vitro: Negative Evidence from a Study of Thymidine Uptake "
Brit. J. Haemat. 13:68(1967)

13) Cooper,E.H. " Measuring Lymphocyte Transformation "
Lancet I 51(1966)

14) Cooper,H.L.,Rubin,A.D."RNA Metabolism in Lymphocytes Stimulated by Phytohaemagglutinin : Initial Responses to Phytohaemagglutinin "
Blood 25:1014(1965)

15) Cowling,D.C.,Quaglinio,D. " Effects of Antigen Mixtures on Blastic Transformation in Leucocyte Cultures "
Lancet I:117(1964)

16) Dixon,F.J. " Development of Specific Immune Function in Early Life"
Rep. Ross. Ped. Res. Conf. 16(1959)

17) Elves,M.W.,Israels,M.C.G.,"Lymphocyte Transformation in Cultures of Mixed Leucocytes. A Possible Test of Histokompatibility "
Lancet I:1184(1965)

18) Elves,M.W.,Israels,M.C.G.," The Response of Lymphocytes to An igen Challange in vitro " Lancet II:806(1963)

19) Epstein,L.B.,Stohlmann jr.F. " RNA Synthesis in Cultures of Normal Peripheral Blodd " Blood 24,1:69(1964)

2o) Fischer,R.,Gropp,A.,Geiger,H. " Cytologische und cytogenetische Untersuchungen an homologen und heterologen Lymphocyten-Mischkulturen" Klin. Wschr. 23:1366(1966)

21) Good,R.A. " Morphologic Aspects of the Development of the Reticuloendothelial System in Early Life " Rep. 29th Ross Fed. Res. Conf. 10(1959)

22) Gough,J., Elves,M.W.,Israels,M.C.G. " The Formation of Macrophages from Lymphocytes in vitro " Exp. Cell Res. 38:476(1965)

23) Gowans,Mc Gregor " The Immunological Activities of Lymphocytes " Progr. Allergy 9:1(1965)

24) Gowans, Mc Gregor,Cowen, Ford " Initiation of Immune Response by Small Lymphocytes " Natur 17:651(1962)

25) Gowans, J.L. " The Recirculation of Lymphocytes From Blood to Lymph in the Rat " J. Physiol 146:54(1959)

26) Gropp,A.,Fischer,R. " Ergebnisse der Züchtung von Lymphocyten in vitro " Klin. Wschr. 12:665(1966)

27) Gropp, A., Fischer, R." Untersuchungen zur Phytohaem-
agglutinin stimulierten Umwandlung von
menschlichen Blutlymphocyten zu blasten-
artigen Zellen "
Virchows Arch. path. Anat. 338:64(1964)

28) Hashem,N. " Blastoid Transformation of Lymphocytes "
Lancet II:742(1965)

29) Heitmann,H.J. " Zur Methodik der Lymphocytenkultur als
Allergie Test "
Hautarzt 4:152(1967)

30) Hirschhorn, K.,Bach,F.,Kolodny,R.L.Hashem,N.,Firschein,I.L.
" Immune Response and Mitosis of Human
peripheral Blodd Lymphocytes in vitro "
Science 143:1185(1963)

31) Huber,H.,Huber,C.,Braunsteiner,H. " Klinische Bedeutung
der Lymphocytenkultur "
Dtsch. Med. Wschr. 9:43(1966)

32) Huber,H.,Gabl,F. " Fortschritte in der Testung von
Transplantationsantigenen "
Dtsch. Med. Wschr. 17:807(1967)

33) Huber,H.,Huber,C.,Braunsteiner,H., " Grundlagen der
Lymphocytenkultur "
Dtsch. Med. Wschr. 8:360(1966)

34) Mc.Kinney,A.A.,Stohlmann jr.F.,Brecher,G. " The Kinetics
of Cell Proliferation in Cultures of Human
Peripheral Blood "
Blood 19,3:349(1962)

35) Klima, R. " Grundlagen für eine Neuordnung der
Haematologie zellulärer Reaktionen im
lymphatischen Apparat "
Wiener Zschr. Inn. Med. 4:10(1952)

36) Kolodny,R.L.,Hirschhorn,K. " Properties of Phytohaem-
agglutinin on Leukocytes "
Nature 201:715(1964)

37) Lindahl-Kiessling,K.,Böök,J.A. " Effects of Phytohaem -
agglutinin on Leukocytes "
Nature 591(1964)

38) Ling, N.R.,Husband,E.M " Specific and Non - Specific
Stimulation of Peripheral Lymphocytes "
Lancet I:363(1964)

39) Lycette,R.R.,Pearmain,G.E. "Immunological Organisation and
Activity of White-Blood-Cells Cultures "
Lancet I:434(1965)

40) Marshall,Roberts " The Growth and Mitosis of Human Small
Lymphocytes after Inkubation with a
Phytohaemagglutinin "
Quart. J. Exp.Physiol. 48:146(1963)

41) Nowell, P.C. " Phytohaemagglutinin: An Initiator of
Mitosis in Culture of Normal Human
Leukocytes "
Cancer Res. 20:462(1960)

42) Oehme, J. " Das Schicksal der transplacentar über-
getretenen Lymphocyten im Organismus "
Mschr.Kinderheilk. 4:148(1967)

43) Oehme,J. " Antigentoleranz (Immuntoleranz) und
Runt - Disease "
Arch. Kinderheilk. 172:227(1965)

44) Oehme,J.,Hundesnagen,H.,Eschenbach,C. " Über die Passage
markierter Leukocyten vom Muttertier zum
Feten - zugleich ein Beitrag zur Runt-Disease "
Klin. Wschr. 8:430(1966)

45) Porter,K.A.,Joseph,N.H.,Rendall,J.M.,Solinsky,C., Hoehn,R.,Calne,R.Y. " The Role of Lymphocytes in the Rejection of Canine Renal Homotransplantats " Labor. Invest. 9:1080(1964)

46) Robbins, J.H. " Tissue Culture Studies of the Human Lymphocyte " Science 146:1648(1964)

47) Robbins, J.H. " Human Peripheral Blood in Tissue Culture and the Action of Phytohaemagglutinin " Experientia XX/3:164(1963)

48) Sabesin, S.M. " Blastoid Transformation of Lymphocytes " Lancet II:294(1965)

49) Sabesin, S.M. " Lymphocytes of Small Mammals: Spontaneous Transformation in Cultures to Blastoids " Science 149:1384(1965)

50) Sauli,S.,Astaldi,G. " Die Proliferationsaktivität der Leukocyten des normalen menschlichen Blutes in der Gegenwart des Phytohaemagglutinins " Schweiz. Med. Wschr. 41:1475(1963)

51) Silverman, W.A. " Susceptibility to Bacterial Infection in Praemature Infants " Rep. 29th Ross Ped. Res. Conf. 48(1959)

52) Smith, R.T. " Recent Studies of Tolerance to Defined Antigens " Rep. 29th Ross Ped. Res. Conf. 65(1959)

53) Smithwick,E.M.,Berkovich,S. " In vitro Suppression of the Measles Virus (31465) Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 123:276(1966)

54) Trubowitz,S.,Masek,B.,Del Rosario,A. " Lymphocyte Responses to Phytohaemagglutinin in Hodgkins Disease, Lymphatic Leukaemia and Lymphosarcoma "
Cancer 19:2019(1966)

55) Wheeler,W.E. " The Newborn's Susceptibility to Staphylococcal Disease "
Rep. 29th Ross Ped. Res. Conf. 44(1959)

56) Wiener, Spiro, Russel " An Electron Microscopy Study of the Homograft Reaction "
Amer. J. Path. 44:319(1964)

Lebenslauf

Am 18. September 1941 wurde ich, Reinhard Tomerius, als dritter Sohn des Rechtsanwalts und Notars Dr. jur. Franz Bruno Tomerius und seiner Frau Eleonore, geb. Ullrich, in Schneidemühl (Pommern) geboren. Mein Vater fiel 1944 an der Westfront. Im Januar 1945 mußten wir vor den sowjetischen Truppen fliehen und gelangten nach Wolfenbüttel. Hier heiratete meine Mutter 1948 den Rechtsanwalt und Notar Dr. jur. Heinrich Grünkorn.
Von 1948 bis 1952 besuchte ich die Volksschule in Wolfenbüttel, ab 1952 die Große Schule - humanistisches Gymnasium für Jungen - und legte am 28.2.1961 die Reifeprüfung ab.
Mein Studium der Medizin begann ich im Sommer - Semester 1961 an der Freien Universität Berlin und legte dort am Ende des Winter - Semesters 1961/62 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab. Anschließend wechselte ich an die Universität Bonn, wo ich am 9.10. 1963 die ärztliche Vorprüfung bestand. Das Sommer - Semester 1964 verbrachte ich an der Universität Freiburg/ Breisgau und kehrte im Winter - Semester 1964/65 nach Bonn zurück. Dort bestand ich am 7.2.1967 die ärztliche Prüfung.
Am 1. März 1967 begann ich meine Ausbildung als Medizinalassistent an der Kinderklinik der Stadt Braunschweig (Chefarzt: Prof. Dr. med. J. Oehme).

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:
In Berlin :
Günther, von Herrath,Honerjäger,Manecke,Riemschneider,Schwarz, Stein,Tielke
In Freiburg :
Bätzner,Faust,Gattner,Göppert,Haas,Hahn,Heilmeyer,Illig,Kern, Poeck,Zollinger
In Bonn :
Dirscherl,Domenjoz,Egli,von Eiff,Elbel,Habs,Haferkamp,Hagen, Hamperl, Heymer,Hungerland,Imdahl,Janker,Klensch,Langendörfer, Leinbrock,Müller,Pichotka,Röttgen,Steudel,Tonutti,Weigelin.

Mein Dank an dieser Stelle gilt besonders Herrn
Prof. Dr. J. Oehme für die Überlassung des Themas
und die großzügige Unterstützung bei meiner Arbeit.

Allen Ärzten und Schwestern der Kinderklinik Braunschweig
und namentlich der med. techn. Assistentin Frau Bergmann
sei auf diesem Wege für ihre freundliche Hilfe herzlich
gedankt.